

UCD: 57.085:581.192:635.64

Оригинален научен труд

Original research paper

**КАПСАИЦИН - МОЖЕН ИНХИБИРАЧКИ ФАКТОР ВО
АНДРОГЕНЕЗАТА НА ПИПЕРКАТА****Колева-Гудева Лилјана*****Краток извадок**

Андрогенезата на пиперката е доста лимитирачки процес кој е проследен со многу инхибирачки фактори како: генотипот; структурата и стадиумот на микроспорите т.е. микроспорите се погодни за индукција на андрогенеза во фазата на првата поленова митоза или непосредно пред неа; генетската предиспозиција за соматската ембриогенеза; хормоналната регулација во *in vitro* услови; условите на раст, како и многу други фактори. Науката сè уште нема доволно објаснувања за сите познати и непознати ограничувачки фактори за овој процес кај видовите од родот *Capsicum*. Инхибиторното влијание на секундарните метаболити, особено капсаицинонот, воопшто не е истражувано, иако во литературата постојат податоци дека некои бабурести и слатки генотипови имаат поголем андрогенетски потенцијал од лутите генотипови на пиперката.

Резултатите од овие истражувања, изведени на девет различни по лутина сорти пиперка, покажуваат дека андрогенетскиот потенцијал во култура од антери на пиперка е зависен од содржината на капсаицин во плодовите на пиперката. Најверојатно генетската предиспозиција за синтеза на секундарни метаболити - капсаицин, покрај сите други фактори, исто така има инхибиторен ефект врз соматската ембриогенеза на пиперката.

Клучни зборови: пиперка *Capsicum annuum* L., култура на антери, *in vitro*, капсаицин

*Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, „Гоце Делчев“ б.б., 2 400 Струмица, Република Македонија, E-mail: liljanak@isc.ukim.edu.mk

*Institute of Southern Crops-Strumica, Goce Delcev b.b., 2 400 Strumica, Republic of Macedonia, E-mail: liljanak@isc.ukim.edu.mk

CAPSAICIN – POSSIBLE INHIBITORY FACTOR OF ANDROGENESIS OF PEPPER

Koleva-Gudeva Liljana*

Abstract

The androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.) is very limiting process and it is followed by many inhibitory factors such as: pepper genotype; the structure and the stadium of microspores i.e. microspores are suitable for the induction of androgenesis in the phase of first pollen mitosis or just before it; the genetic predisposition for somatic embryogenesis; the hormonal regulation in vitro condition; growth conditions; and many others. Science does not have enough explanations for all known and unknown limiting factors of this process in the species of *Capsicum* genus. The inhibitory influence of secondary metabolites, especially capsaicin, is not explored at all, but in the literature there are data that some pepper genotypes as bell-shape and sweet ones have higher androgenetic potential than the hot genotypes.

The results from the present research work, performed on nine varieties of pepper which differ in spicy, showed that the androgenetic potential of the pepper in anthers culture is dependent on the capsaicin contained in the fruits of the pepper. Most probable the genetic predisposition for synthesis of secondary metabolites - capsaicin, beside all the other factors is also inhibitory trait of the somatic embryogenesis of the pepper.

Key words: *pepper Capsicum annuum* L., *anther cultures*, *in vitro*, *capsaicin*

1. Вовед

George и Narayanaswamy (1973) ја добиле првата експериментална андрогенеза со култура на антери кои содржеле зрели поленови зрна. Првата успешна андрогенеза на пиперка ја добил во 1981 година Dumas de Valux. Имено, со култура од антери авторот добива хаплоидни и диплоидни хибриди на пиперка, и тоа кај различни вариетети. Воедно, испитувана е и стимулацијата на андрогенезата со температурен третман, како и со различна концентрација и комбинација на повеќе фитохормони.

Врз принцип на методот на Dumas de Valux авторите Mityko и Fary (1997), како и Dolcet-Sanjuan и sor. (1997) добиле хаплоидна пиперка од неколку различни сорти.

И покрај тоа што андрогенезата е возможна од многу видови на земјоделски култури и дрвја, способноста на секој вид за успешна

пропагација на микроспорите често е ограничена на само еден генотип или вариетет. Всушност, причината за оваа рестриктивна појава сè уште е непозната и, за жал, успешните генотипови често немаат комерцијално значење. Изборот на третманот кој би се употребил за секој нов генотип или вид може да се заснова само на консултираната обемна литература за култура на антери во комбинација со сознанијата за регенерација на соодветниот генотип или вид (Collins и Edwards, 1998).

Клиничките испитувања, *in vivo* и *in vitro*, покажуваат дека биолошкиот потенцијал на капсаицинот потекнува од неговата неверојатно силна и стабилна структура на секундарен метаболит - алкалоид, а оттаму доаѓа и неговото повеќекратно инхибиторно дејство. За капсаицинот како инхибитор во култура *in vitro* сè уште малку се знае, а од друга страна докажано е дека лути сорти од пиперка потешко се регенерираат во *in vitro* услови за разлика од слатките сорти.

Во 1993 Quin and Rotino, а подоцна во 1994 Ltifi and Wenzel, во култура од антери на пиперка на слатки и лути сорти констатирале дека лутите сорти имаат помал андрогенетски потенцијал или воопшто не формираат ембриониди. Оваа појава ја припишале на ефектот од различните регулатори на раст во хранливиот медиум, како и на различните генотипови врз андрогенетските процеси.

2. Материјал и методи на работа

2.1. Одредување на содржината на капсаицин во *in vivo* плодови на пиперка

Од *in vivo* услови беше земен растителен материјал од плодови на девет сорти на пиперка одгледувани во оранжериски услови, и тоа: *слајко луџа*, *луџа везена*, *сиврија*, *феферона*, *злајен медал*, *курџовска кайија*, *калифорниско чудо*, *фехерозон* и *ројунд*. Сите растителни примероци за анализа на содржината на капсаицинот беа исупени до воздушно сува маса (на собна температура 6-7 дена). Дополнителната влага е коригирана со сушење на пробите во термостат до константна тежина на температура од 105°C со времетраење од 5 часа. Екстракцијата на капсаицинот од сувиот растителен материјал (0,1-0,5 g) беше изведена со 96% етанол во водена бања на температура од 40°C, за времетраење од 5 часа. Потоа, со водена вакум филтрација е добиен

етанолниот екстракт на капсаицинонот кој соодветно е разредуван за отчитување. Апсорбанцата на вкупниот капсаицинон во етанолниот екстракт беше мерена спектрофотометриски на бранова должина од 281 нм.

2.2. Одредување степенот на андрогенезата кај пиперката

Како почетен материјал користени се незрелите пупки од истите девет сорти на пиперка кои содржат антери со микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата. Стерилизацијата на пупките се одвиваше на следниот начин: најпрво пупките се промиваат во водоводна вода; потоа следи промивање во дестилирана вода; потоа 15 секунди во 70% C_2H_5OH ; па 10 минути во 5% $Ca(ClO)_2$ со 2-3 капки Tween 20 и на крај пупките се промиваат неколкупати во стерилна вода. Изолираните антери од 3 пупки потоа се поставуваат во петриеви садови со пречник од 5 см и тоа со конкавната страна да го допираат индуктивниот медиум.

За индукција на микроспорите на пиперката беа користени медиумите на (Dumas de Valux, 1981). Периодот на индукција од 12 дена со температурен третман е неопходен за формирање на хаплоидни и спонтани двојно хаплоидни ембриониди од микроспорите. Тој се одвива на СР медиумот во две фази и тоа:

- првите 8 дена антерите се инкубираат на темно и на $+35\pm 2^\circ C$;
- следните 4 дена во клима комора на $+25\pm 2^\circ C$, 12 h светло / 12 h темно.

По 12 дена инкубација антерите беа пренесени на R_1 медиум на $+25\pm 2^\circ C$, 12 h светло/12 h темно каде што е одредуван андрогентскиот потенцијал преку процентот антери кои формирале хаплоидни ембриониди.

3. Резултати и дискусија

Резултатите од испитувањата за содржината на капсаицинон во плодовите на пиперката ги потврдија очекуваните резултати, што значи дека лутите сорти (*феферона*, *слајко луџа*, *везена луџа*) имаат највисока содржина на капсаицинон, за разлика од слатките сорти (*сиврија*, *злајен медал*, *курџовска каџија*), кои имаат пониски вредности, а бабурестите сорти (*калифорниско чудо*, *фехерозон*) и домотовидната сорта (*рошунд*) имаат најниски вредност и според што статистичката анализа, пресметана по t-тест на независни примероци, покажа дека сите разлики што се јавуваат во содржината на капсаицинонот во плодовите на пиперка се статистички мошне

сигнификантни (табела 1). Тоа значи дека највисоки вредности се јавуваат кај сортата *феферона* ($901,27 \pm 51,80^{**} \mu\text{g/g}$), а најниски кај бабурестата сорта *фехерозон* ($205,76 \pm 93,69^{**} \mu\text{g/g}$). И процентуалната вредност на содржината на капсаицин во плодовите на испитуваните сорти ја следи истата динамика како и за вредностите за $\mu\text{g/g}$ свежа маса.

Врз основа на добиените резултати од истражувањата за андрогенетскиот потенцијал може да се каже дека сите испитувани сорти не се способни за формирање на хаплоидни ембриоиди (Слика 1). Всушност, ембриогенетски антери се јавуваат со статистичка сигнификантност само кај сортите *слајко луџа* ($2,43 \pm 0,20^{*}\%$, $p=0,05$), *злајен медал* ($3,31 \pm 0,24^{*}\%$, $p=0,05$), *курјовска каџија* ($1,55 \pm 0,50^{*}\%$, $p=0,05$), *калифорниско чудо* ($6,16 \pm 0,28^{*}\%$, $p=0,05$) и *фехерозон* ($35,36 \pm 1,00^{***}\%$, $p=0,001$). Табела 2, Слика 1.

4. Заклучок

Пиперките се непредвидливи култури во услови *in vitro* и, поради тоа, резултатите кои се добиваат со култура на клетки и ткива се умерени, а културата на антери по сè изгледа дека е единствен исклучок од ова правило (Mityko и Fari, 1997).

Најверојатно инхибирачкото дејство на капсаициноот има влијание во формирањето на хаплоидните ембриоиди. Така на пример, сортите кои содржат повеќе капсаицин воопшто немаат андрогенетска способност. Механизмот на дејството на капсаициноот врз процесите кои се одвиваат во услови *in vitro* сè уште е непознат.

Литература

- Dolcet-Sanjuan R., Claveria, E., Huerta, A. (1997): Androgenesis in *Capsicum annuum* L. – Effects of Carbohydrate and Carbon Dioxide enrichment, *J. Amer. Soc. Sci.* 122(4):468-475.
- Dumas de Valux, R., Chambonnet, D., Pochard, E. (1981): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by + 35°C treatments. *Agronomie* 1(10): 859-864.
- George L., Narayanaswamy, S. (1973): Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis, *Protoplasma* 78, 467-470.
- Collin H. A. Edwards S. (1998): Plant Cell Culture, *BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK*.
- Ltifi, A., Wenzel, G., 1994. Anther culture of hot and sweet pepper (*Capsicum annuum* L.): Influence of genotype and plant growth temperature. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 13: 74-77.

Mityko, Judit, Fari M., (1997): Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture, *Hort. Biotech and breeding, ISHS 1997, Acta Hort.* 447: 281-287.

Quin, X., Rotino, G.L., 1993. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 12: 59-62.

Табела 1. Содржина на капсаицин во плодови на пиперка (*Capsicum annuum* L.)

Table 1. The content of capsaicin in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.)

Сорта Variety	Содржина на капсаицин во свежа маса Content of capsaicin in fresh mass	
	(µg/g)	(%)
<i>феферона</i> Ferona	901,27±51,80**	0,0895±0,0007**
<i>слаатко лутѝа</i> Slatko luta	863,30±3,88***	0,0866±0,0002***
<i>везена лутѝа</i> Vezana luta	618,65±1,90**	0,0615±0,0007**
<i>сивриѝа</i> sivrija	532,44±34,58**	0,0520±0,0337*
<i>златѝен медал</i> Goleden medal	324,27±70,14*	0,0330±0,0084*
<i>курѝовска кайѝѝа</i> Kurtovska kapija	271,10±5,04**	0,0272±0,0002*
<i>калифорниско чудо</i> California wonder	234,98±10,30**	0,0235±0,0070*
<i>роѝунд</i> Rotund	216,86±9,39**	0,0217±0,0003**
<i>фехерозон</i> Feherözön	205.76±93.69 e	0,0205±0,0007*

*Вредностите во секоја колона (група) означени со *, **, *** се сигнификантно различни (p<0,05); p=0,05*, p=0,01**, p=0,001***; ±S.D., n=2.

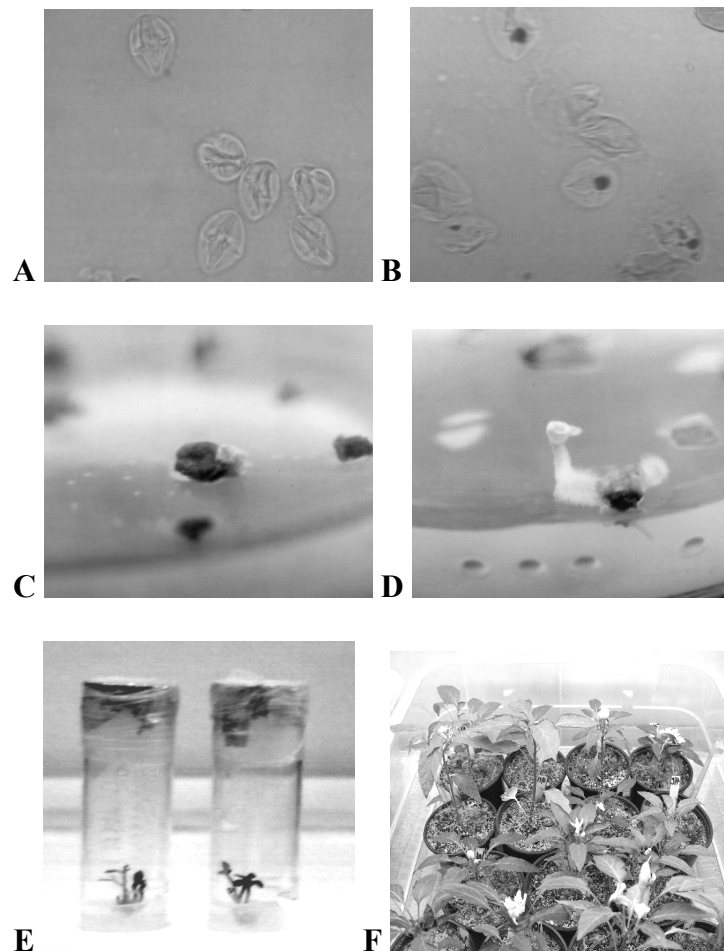
*The values in each column (group) marked with *, **, *** are significant different (t- test on dependent examples p<0,05); p=0,05*, p=0,01**, p=0,001***; ±S.D., n=2

Табела 2. Индукција на хаплоидни ембриоиди од антери на пиперка
Table 2. Haploid embryo induction from pepper anthers

Сорти пиперка Pepper varieties	Бр. на антери Nr. of anthers	Ембриогенетски антери (%) Embriogenetic anthers (%)	Бр. на ембриоиди на 100 антери Nr. of embryos per 100 anthers	Ембрио-генетски потенцијал Embryogenetic response
<i>феферона</i> Ferona	79±90	-	-	-
<i>слајко луџа</i> Slatko luta	140±17	2,43±0,20*	3,33±0,57**	слаб poor
<i>везена луџа</i> Vezana luta	83±80	-	-	-
<i>сиврија</i> Sivrija	104±15	-	-	-
<i>злајен медал</i> Goleden medal	94±90	3,31±0,24*	3,66±0,57**	слаб poor
<i>курџовска кайија</i> Kurtovska kapija	120±11	1,55±0,50*	2,66±0,57**	слаб poor
<i>калифорниско чудо</i> California wonder	151±15	6,16±0,28*	5,66±0,57**	просечен fair
<i>ројунд</i> Rotund	109±10	-	-	-
<i>фехерозон</i> Féherözön	130±15	33,66±6,02**	55,36±1,00***	одличен excellent

*Вредностите во секоја колона означени со *, **, *** се сигнификантно различни ($p < 0,05$, т-тест на зависни примероци); $p = 0,05$ *, $p = 0,01$ **, $p = 0,001$ ***; \pm S.D., $n = 2$.

*The values in each column (group) marked with *, **, *** are significant different (t- test on dependent examples $p < 0,05$); $p = 0,05$ *, $p = 0,01$ **, $p = 0,001$ ***; \pm S.D., $n = 2$.



Слика 1. А) Микроспори во стадиум на прва поленова митроза (x400), В) Микроспори после 6 дена во култура (x400), С) Појава на ембрионид после 30 дена во култура, D) Развој на млад изданок од ембрионид, Е) Регенерација на изданоци на V₃ медиум, F) Развој на растенија во клима комора.

Figure 1. A) Microspores in stadium of first pollen mitosis (x400), B) Microspores after 6 days in culture, (x400), C) Direct embryo in emerging from the anther after 30 days of culture, D) A young plantlet developed from an embryo, E) Microplants regenerant on V₃ medium via anther culture of pepper, F) Developed plant in climate chamber on acclimatization.